

Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒的法医学应用

邹凯南¹, 曹禹¹, 夏子芳², 郑卫国², 周怀谷¹

(1. 上海市公安局物证鉴定中心 上海市现场物证重点实验室, 上海 200083; 2. 无锡中德美联生物技术有限公司, 江苏 无锡 214174)

摘要: 目的 验证 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒的法医学应用价值。方法 取 FTA 卡、滤纸上保存的建库血样和各类涉案生物性检材 1948 份, 用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒进行 STR 分型检测, 同时采用 Sinofiler™、Identifiler®、PowerPlex® 16 试剂盒进行平行试验。对 4 个试剂盒相同基因座的分型进行比对, 以确认 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒的灵敏度和准确性。结果 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒的检测成功率为 97.79%, 同一样本在相同基因座与 Sinofiler™、Identifiler®、PowerPlex® 16 试剂盒的 STR 分型结果相同。结论 利用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒进行 STR 分型, 信息量大、结果准确可靠, 可应用于法庭科学。

关键词: 法医遗传学; 短串联重复序列; Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒

中图分类号: DF795.2 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2012.06.013

文章编号: 1004-5619(2012)06-0448-03

Forensic Application of Expressmarker 22 STR Loci Direct PCR Amplification Kit

ZOU Kai-nan¹, CAO Yu¹, XIA Zi-fang², ZHENG Wei-guo², ZHOU Huai-gu¹

(1. Shanghai Key Laboratory of Crime Scene Evidence, Institute of Forensic Science, Shanghai Public Security Bureau, Shanghai 200083, China; 2. AGCU Biotechnology Company, Wuxi 214174, China)

Abstract: Objective To explore the application value of Expressmarker 22 STR loci direct PCR amplification kit. **Methods** One thousand nine hundred and forty-eight samples (including samples spotted on FTA cards, filter papers and case samples) were tested using Expressmarker 22 STR loci direct PCR amplification kit. At the same time, all were tested using Sinofiler™ kit, Identifiler® kit and PowerPlex® 16 kit respectively for comparison. The genotypes were compared at the same STR loci among these four kits to test the sensitivity and accuracy of Expressmarker 22 STR loci direct PCR amplification kit. **Results** 97.79% samples were successfully typed using Expressmarker 22 STR loci direct PCR amplification kit. The genotype profiles of the same samples using Expressmarker 22 STR loci direct PCR amplification kit were consistent with Sinofiler™ kit, Identifiler® kit and PowerPlex® 16 kit at the same STR loci. **Conclusion** Expressmarker 22 STR loci direct PCR amplification kit can provide huge information and accurate results and be applied to forensic DNA genotyping.

Key words: forensic genetics; STR; Expressmarker 22 STR loci direct PCR amplification kit

近年来, DNA-STR 分型技术已成为个体识别和亲子鉴定的重要手段。目前, 国内法庭科学检验中常用 Identifiler®、Sinofiler™、PowerPlex® 16、DNATyper™ 15、AGCU17+1 和 Goldeneye 20A 共 6 个 STR 试剂

盒, 其中广泛用于公安 DNA 实验室的是前 5 种试剂盒, 期望的随机匹配概率为 $6.983 \times 10^{-21} \sim 1.284 \times 10^{-17[1]}$, 但其共有的 STR 基因座仅有 11 个, 给不同试剂盒间的复核检验及全国公安机关 DNA 数据库比对带来了不便。当前, 为提高“打拐专项行动”中亲子鉴定检验的比对效能, 公安部要求 DNA 鉴定检测 18 个以上 STR 基因座, 因此法医 DNA 实验室往往必须同时检测 2 个以上试剂盒, 由此增加了检验工作量和检验成本。

本研究在研制快速 PCR 扩增体系^[2]的基础上, 选择国内法庭科学检验中常用的性别基因座和 21 个 STR 基因座(包含上述 6 种 STR 试剂盒中所有的 STR

基金项目: 公安部重点研究计划项目(2009ZDYJSHSJ012); 上海市科学技术委员会科研计划项目(09231203600)

作者简介: 邹凯南(1983—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 主要从事法医 DNA 分析技术的应用和研究; E-mail: kitty_zkn@126.com

通信作者: 周怀谷, 男, 博士, 主任法医师, 主要从事法医 DNA 分析技术的应用和研究; E-mail: hgzhou803@hotmail.com

基因座),开发出 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒,并在日常鉴定工作中检验了其应用价值。

1 材料与方法

1.1 样本

建库血样:共 1 325 份,保存在 FTA 卡或滤纸上。

涉案检材:共 623 份,包括陈旧血斑、唾液斑、肋软骨、毛发、组织块、阴道拭子、精斑和脱落细胞。

1.2 主要试剂与仪器

Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒(自制)、Sinofiler™ 试剂盒(美国 AB 公司)、Identifiler® 试剂盒(美国 AB 公司)、PowerPlex® 16 试剂盒(美国 Promega 公司)、ReadyAmp™ Genomic DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司)。

BSD 600-Duet 自动打孔仪(澳大利亚 BSD 公司)、9700 型扩增仪(美国 AB 公司)、3130XL 型遗传分析仪(美国 AB 公司)。

1.3 方法

1.3.1 试剂盒准确性验证

每份建库血样,用 BSD 600-Duet 自动打孔仪打孔取下一个小圆片(直径 1.2 mm),放入 96 孔板,直接用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒进行分型。接着再次打孔取下另一个小圆片(直径 3.2 mm),通过 ReadyAmp™ Genomic DNA 提取试剂盒抽提 DNA,分别采用 Sinofiler™ 试剂盒、PowerPlex® 16 试剂盒进行分型。

涉案检材,均采用 ReadyAmp™ Genomic DNA 提取试剂盒提取 DNA,分别采用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒、Identifiler® 试剂盒进行分型。

1.3.2 试剂盒灵敏度检验

以对照品 DNA 9947A 为模板,经不同梯度稀释(25 μL PCR 体系中 DNA 含量依次为 0.01、0.02、0.05、0.12、0.5、1 ng),用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒进行分型。

1.3.3 STR 扩增及分型

Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒反应体系为 25 μL,内含反应混合液 10 μL,引物 5 μL,热启动 C-Taq 聚合酶 1 μL(5 U/μL),DNA 模板与纯水共 9 μL。扩增条件:95℃ 2 min;94℃ 30 s,60℃ 60 s,72℃ 60 s,循环 10 次;90℃ 30 s,58℃ 60 s,72℃ 60 s,循环 20 次;72℃ 10 min,最后置于 4℃ 保存。扩增在 9700 型扩增仪上进行。

Identifiler® 试剂盒、PowerPlex® 16 试剂盒、Sinofiler™ 试剂盒反应体系均为 25 μL,按照操作说明书使用,扩增均在 9700 型扩增仪上进行。

PCR 产物用 3130XL 型遗传分析仪进行毛细管电泳,用 GeneMapper ID v3.2 软件进行基因型分析。

2 结果

2.1 分型准确性

1 325 份血样和 623 份常规生物性检材经 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒、Sinofiler™ 试剂盒、Identifiler® 试剂盒和 PowerPlex® 16 试剂盒检测,在相同的基因座分型结果一致。用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒均得到清晰完整的 STR 分型图谱(图 1 示一烟蒂检材的分型图谱),9947A 分型正确。该试剂盒的检测成功率为 97.79%(表 1);基因座为杂合子时,峰高较均衡;等位基因扩增片段大小与等位基因标准对照品的偏差为 ±0.5 bp,相对荧光强度(RFU)均大于 200。

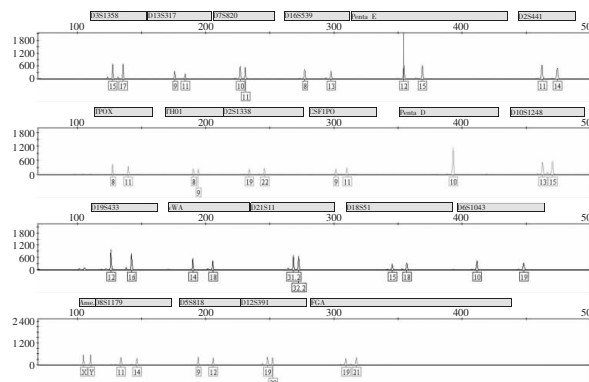


图 1 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒对烟蒂 DNA 的分型结果

表 1 各类检材用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒检测的成功率

| 检材种类 | 检验例数 | 成功检出例数 | 成功率/% |
|---------|-------|--------|--------|
| 建库血样 | 1 325 | 1 319 | 99.55 |
| 陈旧血斑 | 378 | 367 | 97.09 |
| 唾液斑 | 116 | 112 | 96.55 |
| 肋软骨 | 35 | 35 | 100.00 |
| 毛发 | 15 | 8 | 53.33 |
| 组织块 | 21 | 20 | 95.24 |
| 阴道拭子、精斑 | 33 | 33 | 100.00 |
| 脱落细胞 | 25 | 11 | 44.00 |
| 合计 | 1 948 | 1 905 | 97.79 |

2.2 灵敏度

以不同浓度的对照品 DNA 9947A 为模板,Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒检测结果显示,25 μL 体系中 9947A 量为 0.12、0.5、1 ng 时均可获得完整的分型图谱,但 DNA 量在 0.05 ng 以下时则只能检出部分基因座(表 2)。

表 2 25 μL 体系中不同 DNA 量的检测结果

| 9947A 含量/ng | 检出 STR 基因座数 |
|-------------|-------------|
| 0.01 | 1 |
| 0.02 | 3 |
| 0.05 | 7 |
| 0.12 | 22 |
| 0.5 | 22 |
| 1 | 22 |

2.3 稀有等位基因的验证结果

经 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒分型, 一些样本在 *D2S441* 基因座检见稀有等位基因(OL), 见图 2~3。经测序, 按照国际法医遗传学会 DNA 委员会 (ISFG) 推荐的原则命名, 发现在等位基因 9、10 之间存在稀有等位基因 9.1, 其序列特征为 (TAGA)₉T (图 4); 在等位基因 10、11 之间存在稀有等位基因 10.1, 其序列特征为 (TAGA)₅(TAGG)(TAGA)₄T (图 5)。

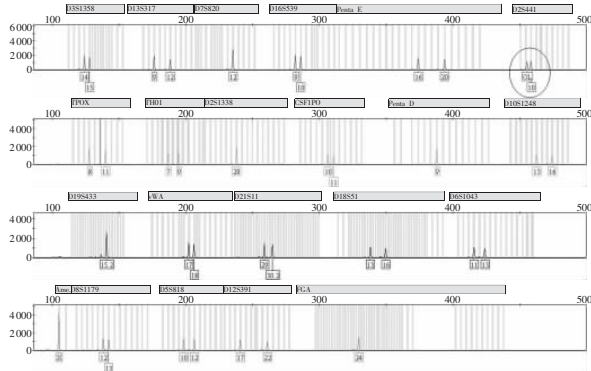


图 2 *D2S441* 基因座在等位基因 9、10 之间的 OL

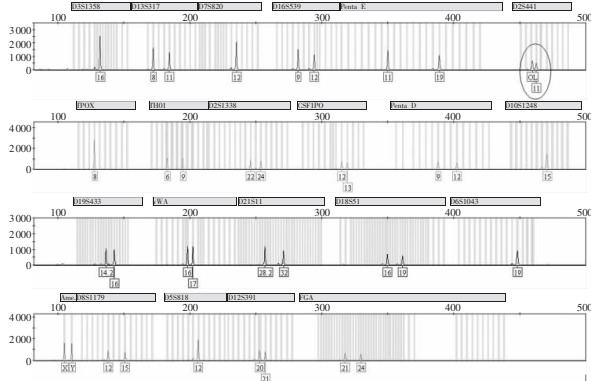


图 3 *D2S441* 基因座在等位基因 10、11 之间的 OL

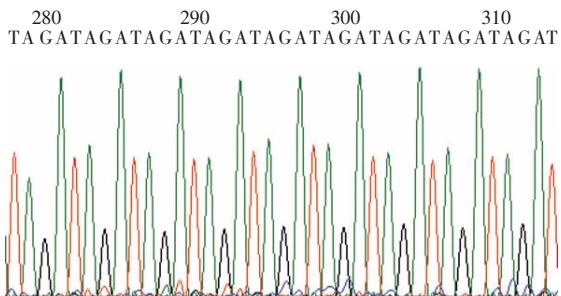


图 4 *D2S441* 基因座等位基因 9.1 的测序结果

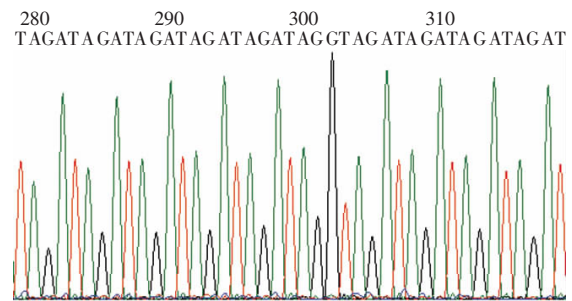


图 5 *D2S441* 基因座等位基因 10.1 的测序结果

3 讨论

Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒包含 *Amelogenin* 和如下 STR 基因座: *D3S1358*、*D13S317*、*D7S820*、*D16S539*、*Penta E*、*D2S441* (引物用 FAM 荧光素标记); *TPOX*、*TH01*、*D2S1338*、*CSF1PO*、*Penta D*、*D10S1248* (引物用 HEX 荧光素标记); *D19S433*、*vWA*、*D21S11*、*D18S51*、*D6S1043* (引物用 TAMRA 荧光素标记); *D8S1179*、*D5S818*、*D12S391*、*FGA* (引物用 ROX 荧光素标记)。该试剂盒中含有常用 STR 检测试剂盒中的所有基因座, 可同步对 21 个 STR 基因座进行分型检测, 明显减少了检验工作量和检验成本, 符合法庭科学实验室的需求。

本研究显示, 采用 Expressmarker 22 STR 荧光检测试剂盒进行检验的分型图谱清晰, 与目前通用的 Sinofiler™、Identifiler®、PowerPlex® 16 试剂盒在共有基因座的分型结果一致, 说明其设计合理, 符合法庭科学鉴定的要求。

关于 *D2S441* 基因座^[3-4], 黄代新等^[5]曾对该基因座在成都地区汉族人群的多态性进行调查, 发现了等位基因 9.1。本研究通过对 1948 份样本的检测, 发现一些样本在 *D2S441* 基因座存在稀有等位基因 9.1、10.1, 可用于该试剂盒等位基因阶梯(Ladder)的改进。

参考文献:

- [1] 葛建业, 严江伟, Bruce Budowle, 等. 关于法庭科学 DNA 数据库若干问题的探讨[J]. 中国法医学杂志, 2011, 26(3): 252-255.
- [2] 周怀谷, 夏子芳, 陈荣华, 等. 快速个体识别 STR 分型技术[J]. 法医学杂志, 2010, 26(5): 381-382.
- [3] 白雪, 丛斌, 李淑瑾, 等. 西北汉族人群 *D10S1248*、*D2S441*、*DIS1677*、*D9S1122*、*D10S1435* 等 5 个 miniSTR 基因座的遗传多态性及其法医学应用[J]. 遗传, 2009, 31(4): 381-386.
- [4] 李霞, 丛斌, 李淑瑾, 等. 3 个 miniSTR 基因座在湖南汉族人群中的遗传多态性[J]. 法医学杂志, 2009, 25(2): 112-114.
- [5] 黄代新, 张林, 吴梅筠, 等. 成都地区汉族人群 *D2S441* 位点的遗传多态性研究[J]. 法医学杂志, 2001, 17(1): 15-16, 18.

(收稿日期: 2012-05-16)

(本文编辑: 李莉)